

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij *Nutricionizam*

Tonći Kapuralić
6855/N

**IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH
KOMPONENATA IZ CVIJETA I LISTA TRNINE**
ZAVRŠNI RAD

Modul: Organska kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Senka Djaković

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH KOMPONENATA IZ CVIJETA I LISTA TRNINE

Tonči Kapuralić, 6855/N

Sažetak: Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja listopadna biljka koji raste gotovo u cijeloj Europi u ekotonu između šumovitih područja i travnjaka, a obiluje bioaktivnim komponentama koje imaju potencijalan protektivan učinak na zdravlje ljudi. U ovom završnom radu provedena je ekstrakcija fenolnih spojeva po Soxhlet-u, a dobiveni ekstrakt pročišćen je i razdvojen pomoću preparativne tankoslojne kromatografije na četiri frakcije koje su karakterizirane primjenom FTIR-spektroskopije. Ukupni fenoli, flavonoli i hidroksicimetne kiseline određeni su spektrofotometrijski Folin-Ciocalteu metodom, a kvantifikacija etil-acetatnog ekstrakta provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Na temelju provedenih ispitivanja i dobivenih rezultata može se zaključiti da se u osušenim cvjetovima i listovima trnine nalaze značajne koncentracije fenolnih spojeva koji mogu imati biološki potencijal.

Ključne riječi: osušeni cvijet i list trnine, fenolni spojevi, Soxhlet ekstrakcija, TLC, FTIR-spektroskopija, HPLC

Rad sadrži: 29 stranica, 17 slika, 8 tablica, 21 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf formatu) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Senka Djaković

Rad predan: lipanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study in Nutrition
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory of Organic Chemistry

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPONENTS FROM FLOWER AND LEAF OF BLACKTHORN

Tonči Kapuralić, 6855/N

Abstract: Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) is a perennial deciduous plant that grows all over Europe in the ecotone between forested areas and grasslands, and is rich in bioactive components that have potential protective effect on human health. In this final work, an extraction of phenolic compounds was conducted by Soxhlet method and resulting extract was purified and separated into four fractions by preparative thin layer chromatography and characterized using FTIR-spectroscopy. Total phenols, flavonols and hydroxycinnamic acids were determined using Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, while quantification of ethyl acetate extract was carried out using high performance liquid chromatography. Based on the conducted tests and results it can be concluded that dried flowers and leaves of blackthorn contain significant concentrations of phenolic compounds that may have biological potential.

Keywords: dried flower and leaf of blackthorn, phenolic compounds, Soxhlet extraction, TLC, FTIR-spectroscopy, HPLC

Thesis contains: 29 pages, 17 figures, 8 tables, 21 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Senka Djaković, Associate Professor

Thesis delivered: June 2016

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Trnina	2
2.1.1. Rasprostranjenost.....	2
2.1.2. Kemijski sastav	3
2.1.3. Uporaba i ljekovita svojstva.....	4
2.2. Bioaktivne komponente hrane.....	5
2.2.1. Fenolne kiseline	5
2.2.2. Flavonoidi	6
2.2.3. Flavonol glikozidi	8
2.2.4. Procijanidini.....	8
2.3. Izolacija prirodnih spojeva	9
2.3.1. Ekstrakcija.....	9
2.3.2. Infracrvena spektroskopija.....	11
2.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. Cvijet i list trnine	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u	13
3.2.2. Pročišćavanje dobivenog etil-acetatnog ekstrakta	14
3.2.3. Infracrvena spektroskopija.....	16
3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	17
3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola	18
3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina.....	19
3.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Uvod	22
4.2. Izolacija fenolnih spojeva.....	22
4.3. Infracrvena spektroskopija.....	23
4.4. Ukupna koncentracija fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina.....	26
4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	26
5. ZAKLJUČAK	27
6. LITERATURA.....	28

1. UVOD

Ovaj završni rad uklapa se u istraživanje na području bioaktivnih komponenata u biljnim ekstraktima koja su u okviru HRZZ projekta: *Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)*, koji se dijelom izvode i u Laboratoriju za organsku kemiju, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka koja raste kao trnovit, listopadni grm u gotovo cijeloj Europi, a uglavnom se može pronaći u ekotonu između šumovitih područja i travnjaka. Bijeli cvjetovi prisutni su na biljci od ožujka do svibnja, a plodovi ljubičaste boje sazrijevaju u kasno ljeto i jesen, iako se mogu naći na biljci i tijekom zimskog razdoblja. Osušeni cvjetovi i listovi trnine sadrže visoke koncentracije biološki aktivnih komponenata od kojih su najistaknutiji fenolni spojevi kao što su flavonol glikozidi, procijanidini te derivati hidroksicimetne kiseline. Brojna istraživanja tijekom posljednjih godina podupiru ulogu fenolnih spojeva u prevenciji degenerativnih oboljenja, posebice karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Gotovo svi dijelovi trnine pronašli su svoju primjenu u medicini i prehrambenoj tehnologiji. Potpuno zreli plodovi koriste se za izradu džemova, želea, vina, octa i destiliranih alkoholnih pića, dok se cvjetovi, latice i listovi koriste za pripremu čajeva, sirupa, svježih sokova i tinktura, a smanjuju simptome anemije, dijareje i drugih gastrointestinalnih tegoba. Velika varijabilnost u koncentracijama fenolnih spojeva unutar pojedine biljke se pripisuje uglavnom čimbenicima kao što su vrsta tla, vlažnost, temperatura, svjetlost i geografski položaj. Kako bi se provela izolacija bioaktivnih komponenata potrebno je provesti ekstrakciju, a najčešće korištena metoda je klasična ekstrakcija uz pogodno otapalo te zagrijavanje kroz određeno vrijeme.

Cilj ovog završnog rada je provesti ekstrakciju fenolnih spojeva u Soxhlet uređaju iz cvijeta i lista trnine, pročistiti i karakterizirati dobivene frakcije te odrediti količinu ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u dobivenom ekstraktu. Ukupni fenoli, flavonoli i hidroksicimetne kiseline određuju se spektrofotometrijski primjenom Folin-Ciocalteu metode, a karakterizacija pročišćenih frakcija IR-spektroskopijom. Kvantifikacija ekstrakta provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Trnina

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka koja raste kao trnovit, listopadni grm na padinama divljih, neobrađenih područja. Formira gustu nadstrešnicu sa zamršenim granama i brojnim izdancima te može narasti i do 5 metara u visinu. Sekundarne grane se često transformiraju u deblu koje je u početku baršunasto meko, crveno-smeđe boje. Pupoljci trnine su globularno-ovalni, također crveno-smeđe boje s više ili manje dlačica, a kora je tamno sive boje. Listovi su naizmjenično dugi 2–5 te 1–2 cm, zelene su boje, obrnuto su jajoliki ili su oblika elipse, s fino nazubljenim lisnim rubovima te s dlačicama obično na donjoj strani lista. Peteljke su duge 0.2–1 cm i također sadrže dlačice. Palistići (stipule) su izduženi i nazubljeni te su obično duži od peteljki. Cvjetovi (slika 1.) su bijele boje, širine 1–1.7 cm te su najčešće osamljeni i pojavljuju se na drškama koje su duge oko 0.5 cm. Lapovi su trokutasto-jajoliki i često nazubljeni. Svaki cvijet sadrži oko 20 prašnika žute ili crvene boje koji su dugi do 0.5 cm. Plod (slika 1.) je koštunjičav, veličine 1–1.5 cm, okruglast i ljubičaste boje sa zelenom pulpom te se teško odvaja od endokarpa.



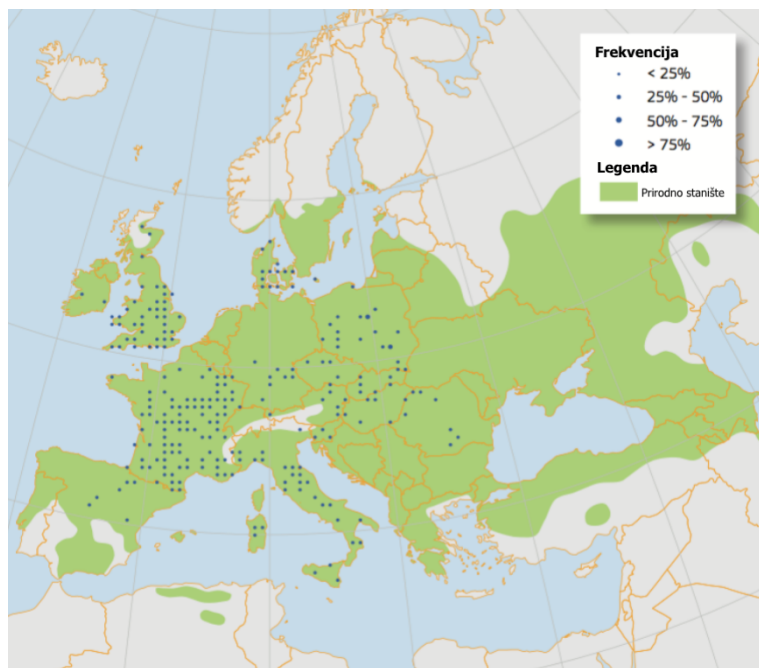
Slika 1. Cvjetovi i plodovi trnine [1]

Trnina cvjeta od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasno ljeto i jesen te se ponekad mogu naći na biljci i tijekom zimskog razdoblja [1].

2.1.1. Rasprostranjenost

Ova biljka raste u većini južne i srednje Europe, osim na donjoj polovici Pirinejskog poluotoka, a širi se sjeverno sve do južnog dijela Skandinavskog poluotoka. Istočno doseže Malu Aziju, Kavkaz i Kaspijsko jezero (slika 2.). Također se može pronaći i na izoliranim područjima u Tunisu i Alžiru, a uvedena je i lokalno uzgajana i u Sjevernoj Americi te na Novom Zelandu. Trnina se može naći na

šumskim rubovima i otvorima, na sunčanim i kamenitim padinama, jarugama, riječnim dolinama, livadama i pašnjacima, na niskim nadmorskim visinama, ali također i u planinama (švicarske Alpe).



Slika 2. Rasprostranjenost trnine u Europi [1]

Trnina se nalazi u pojasu grmlja blizu šuma, odnosno ekotonu između šumovitih područja i travnjaka. Ta područja su uglavnom dio sekundarne vegetacije koja se razvija na napuštenim mjestima ili su faza sekundarne sukcesije livada i pašnjaka koji se nalaze u blizini obrađenih poljoprivrednih područja. Trnina se često u prirodi može pronaći zajedno s ostalim vrstama grmovitih biljaka iz roda *Rosa*, *Rubus*, *Prunus* i *Cornus*, ali i kurikom (*Euonymus europaeus*), glogom (*Crataegus monogyna*) i divljom kalinom (*Ligustrum vulgare*) [1].

2.1.2. Kemijski sastav

Cvjetovi i listovi trnine sadrže značajne koncentracije flavonoida, od kojih koji su najzastupljeniji derivati flavonola (kamferol, kvercetin te njihovi glikozidi sa arabinozom, ramnozom i ksilozom). Također, cvjetovi sadrže proantocijanidine tipa A, dok se u listovima mogu naći koncentracije karotenoida i norizoprenoida. Oba dijela biljke sadrže fenolne kiseline [2].

Osim flavonoida, cvjetovi i listovi sadrže i sterole te triterpene. U cvjetovima su pronađene koncentracije alkohola triterpena od kojih su identificirani α - i β -amirini, od kojih je više zastupljen β -amirin. Također, iz smjese triterpenskih kiselina identificirane su oleinska i ursolična, s većom koncentracijom potonje kiseline. Od sterola je u najvećoj koncentraciji identificiran β -sitosterol, a u malim količinama potvrđena je i prisutnost γ -sitosterola, stigmasterola i sterol glikozida [3].

Plodovi trnine sadrže značajne količine fenolnih antioksidansa, od kojih se po koncentraciji najviše ističu flavonol glikozidi (kvercetin, kamferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivati kumarina, antocijani te proantocijanidini tipa A [4].

2.1.3. Uporaba i ljekovita svojstva

Gotovo svi dijelovi trnine imaju primjenu u medicini i prehrambenoj tehnologiji. Potpuno zreli plodovi se zbog specifičnog astringentnog svojstva većinom koriste za izradu džemova, želea, vina, octa i destiliranih alkoholnih pića. Cvjetovi, laticе i listovi se uglavnom koriste u medicinske svrhe za pripremu čajeva, sirupa, svježih sokova ili tinktura koji smanjuju simptome anemije i dijareje te drugih gastrointestinalnih tegoba. Zbog visoke koncentracije askorbinske i fenolnih kiselina, plodovi se mogu koristiti kao vrijedan izvor prirodnih antioksidansa. Niz usko zasađenih grmova trnine našli su svoju primjenu i kao dekorativna biljka koja može tvoriti prirodnu ogradu ili granicu. Trnina je vrlo važna za životinjski svijet zbog toga što rani cvjetovi predstavljaju izvor nektara za oprašivače, a trnovite grane pružaju sigurnost gnijezdima ptica te štite manje sisavce od predatora [1].

Zbog određene koncentracija pektina plodovi imaju umirujuće i opuštajuće djelovanje na upalu želuca. Infuzija biljke može se koristiti kao blagi laksativ u liječenju opstipacije i konstipacije. Zbog toga što stimuliraju naš metabolizam, plodovi se mogu koristiti za uklanjanje tegoba i u liječenju dermatitisa, herpesa, alergije, prehlade, bubrežnih kamenaca i poremećaja mokraćnog mjehura [5]. Također, antiseptičko djelovanje plodova biljke se ispoljava zbog prisutnosti tanina (polihidroksiflavan-3-ola) pa se može djelotvorno koristiti i kod upala sluznice probavnog trakta [6].

Kemoprotektivan učinak bioaktivnih komponenata trnine često je povezan sa njihovom antioksidativnom aktivnošću. Klorogenska kiselina koja je se može naći i u mnogom drugom ljekovitom bilju odgovorna je za prevenciju oksidativnog stresa. Kvercetin i njegovi derivati su također vrlo učinkoviti antioksidansi te djeluju protektivno na mnoga stanja kao što su rak, kardiovaskularne bolesti te neurodegenerativni poremećaji. Flavan-3-oli, koji su zastupljeni u jako niskim koncentracijama u trnini (ali su prisutni u obliku procijanidina), također iskazuju niz pozitivnih učinaka na zdravlje, posebice antiviralno, inzulinu slično, antioksidativno i protuupalno djelovanje. U usporedbi s resveratolom i askorbinskom kiselinom dimeri i trimeri procijanidina tipa A imaju jednaku ili bolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Antocijani, spojevi koji pridonose boji plodova trnine, također imaju pozitivne terapijske učinke uglavnom zbog njihovih jakih antioksidativnih svojstava [7].

2.2. Bioaktivne komponente hrane

U bioaktivne komponente hrane spadaju esencijalni ili neesencijalni spojevi (e.g. vitamini, polifenoli) koji se pojavljuju u prirodi, dio su prehrambenog lanca, a pokazuju potencijalno pozitivnog djelovanje na zdravlje čovjeka [8]. Esencijalne bioaktivne komponente potrebno je unositi hranom kako bi se izbjegao deficit zbog razvoja kroničnih bolesti, za razliku od fitokemikalija koje se definiraju kao sekundarni biljni metaboliti za koje ne postoje preporuke jer ne može doći do njihovog nedostatka u organizmu čovjeka. Najveća skupina fitokemikalija prisutnih u cvijetu i listu trnine su fenolni spojevi.

Fenolni spojevi ili polifenoli predstavljaju jedne od najrasprostranjenijih i najbrojnijih sekundarnih metabolita u biljnom svijetu. Iako se polifenoli kemijski karakteriziraju kao spojevi sa fenolnim strukturnim značajkama, ova skupina prirodnih spojeva je vrlo raznolika i sadrži nekoliko podgrupa. Prema kemijskoj strukturi aglikona polifenoli se mogu podijeliti na:

- (1) *fenolne kiseline* (derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline);
- (2) *flavonoide* (izoflavoni, neoflavonoidi, čalkoni, flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli, proantocijanidini, antocijanidini);
- (3) *polifenolne amide* (avenantramidi i kapsaicinoidi);
- (4) *ostale polifenolne spojeve* (resveratol, kurkumin, elaginska kiselina itd.).

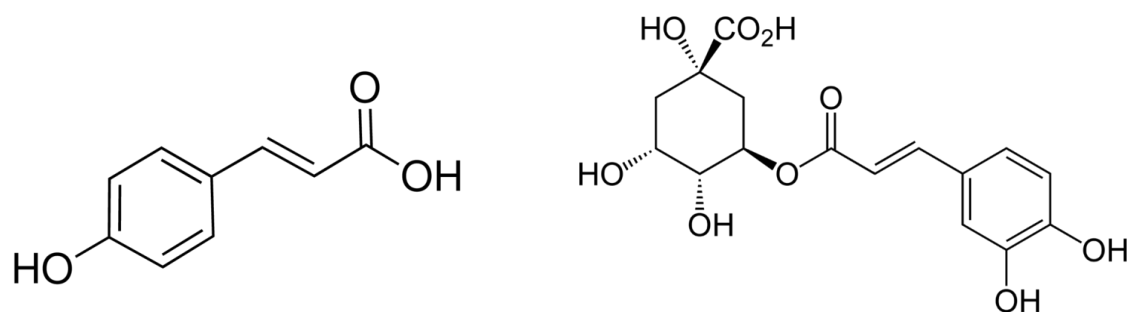
Istraživanja tijekom posljednjih godina snažno podupiru ulogu polifenola u prevenciji degenerativnih oboljenja, osobito karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Polifenoli su snažni antioksidansi koji nadopunjuju funkcije vitamina te enzima koji su aktivni u obrani od oksidativnog stresa posebice uzrokovanog reaktivnim kisikovim vrstama [9].

Zbog brojnih razloga, uključujući strukturne raznolikosti, nedostatak standardiziranih metoda i varijacije sadržaja u određenoj namirnici, vrlo je teško procijeniti dnevni unos polifenola, a iznosi u prosjeku 1000 mg/dan. Glavni prehrambeni izvor polifenola su voće i pića (voćni sokovi, vino, čaj, kava, pivo, itd.), dok povrće, mahunarke i žitarice također mogu doprinijeti dnevnom unosu, ali u manjoj mjeri [10]. U cvijetu i listu trnine uglavnom se nalaze više koncentracije procijanidina, flavonol glikozida te hidroksicimetnih kiselina.

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline spadaju u neflavonoidne polifenolne spojeve koji se s obzirom na strukturu mogu podijeliti na dva glavna razreda: derivate hidroksibenzojeve (C_1 - C_6) i hidroksicimetne (C_3 - C_6) kiseline [9]. U derivate hidroksibenzojeve kiseline pripada galna, *p*-hidroksibenzojeva, siriginska i

vanilinska kiselina, a u derivate hidroksicimetne *p*-kumarinska, kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Derivati hidroksicimetne kiseline pokazuju veći antioksidacijski kapacitet od derivata hidroksibenzojeve kiseline zbog toga što CH=CH-COOH skupina doprinosi boljoj stabilizaciji slobodnih radikala za razliku od COOH skupine kod hidroksibenzojevih kiselina. U cvijetu trnine u većim koncentracijama mogu se naći *p*-kumarinska i klorogenska kiselina (slika 3.), od kojih je potonja ester kafeinske i kininske kiseline.

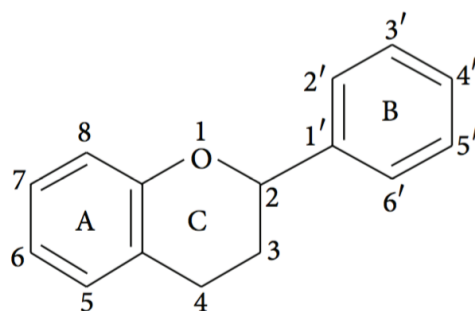


Slika 3. Struktura *p*-kumarinske i klorogenske kiseline

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u raznim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću [11]. Kada je 1930. godine izoliran novi kemijski spoj iz naranče, vjerovalo se da je pripadnik nove klase vitamina i označen je kao vitamin P. Kasnije je postalo jasno da je spoj po kemijskoj strukturi flavonoid (rutin) te od tog trenutka pa do danas identificirano je više od 4000 vrsta [12]. Flavonoidima se pripisuju mnoga terapijska svojstva od kojih se ističu antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a također spomenuti spojevi znatno utječu na boju i okus hrane. U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i za zaštitu od UV zračenja [11].

Osnovnu strukturu flavonoida čini C₆-C₃-C₆ strukturni kostur u kojem su dva benzenska prstena (**A** i **B**) povezana piranskim prstenom **C** koji sadrži kisik (slika 4.). Različiti razredi flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i supstituciji **C** prstena, dok se pojedinačni spojevi u razredu razlikuju prema supstituciji prstenova **A** i **B** [12]. Prema nomenklaturi, osnova strukture flavonoida je kemijski spoj *difenilpropan* iz kojeg gubitkom vode i zatvaranjem **C** prstena nastaje flavan, a iz njega se izvodi određeni broj osnovnih struktura flavonoida: flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavon-3-oli, antocijanidini i izoflavoni. Neki se od njih mogu smatrati derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana.

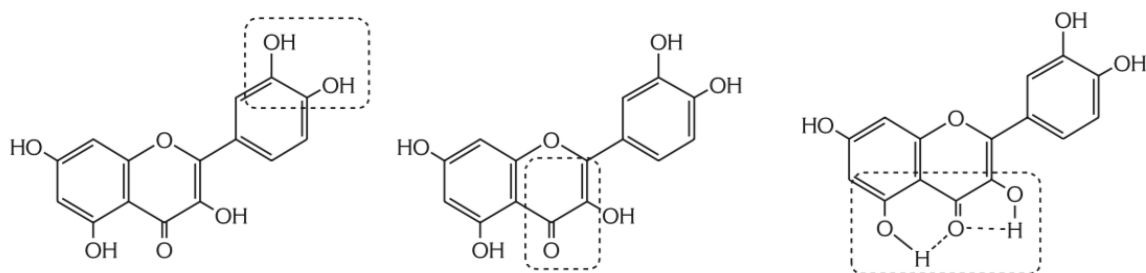


Slika 4. Osnovna struktura flavonoida [11]

Navedeni spojevi mogu biti hidroksilirani, metoksilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadrže i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela. Također, kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini).

Flavonoidi djeluju kao antioksidansi na više mogućih načina, od kojih je najvažnije njihovo svojstvo hvatanja slobodnih radikala zbog čega dolazi do prekida lančanih reakcija. Nastali radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Tri su glavne strukturne značajke flavonoida koje su važne za sposobnost hvatanja slobodnih radikala (slika 5.):

- (1) *o*-dihidroksilna struktura u B prstenu stabilizira radikal i omogućuje delokalizaciju elektrona;
- (2) 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom omogućuje delokalizaciju elektrona;
- (3) hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom.

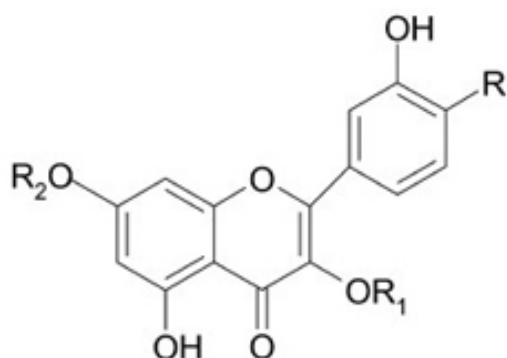


Slika 5. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala [11]

Flavonoid kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta: prisutan u niskoj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji mora usporiti ili spriječiti reakcije oksidacije, a nastali radikal mora biti stabilan kako ne bi poticao lančanu reakciju [11].

2.2.3. Flavonol glikozidi

Flavonoli se u prirodi uglavnom pojavljuju u obliku flavonol glikozida, kod kojih je šećer povezan s aglikonom na C3 i/ili C7 poziciji (slika 6./tablica 1.). Listovi i cvjetovi trnine sadrže značajne koncentracije kamferola, kvercetina te njihovih glikozida. Cvjetovi sadržavaju flavonol glikozide najviše u formi monosaharida vezanih na aglikon, uglavnom kamferol i kvercetin 3-*O*-arabinozide [2]. Također, potvrđena je prisutnost kamferola i kvercetina u obliku kamferol i kvercetin-3-*O*-arabinofuranozida te kamferol 3-*O*-raminopiranozida [13]. Listovi su bogati disaharidima vezanim na aglikon, uglavnom kamferol 3,7-diraminozidom [2].



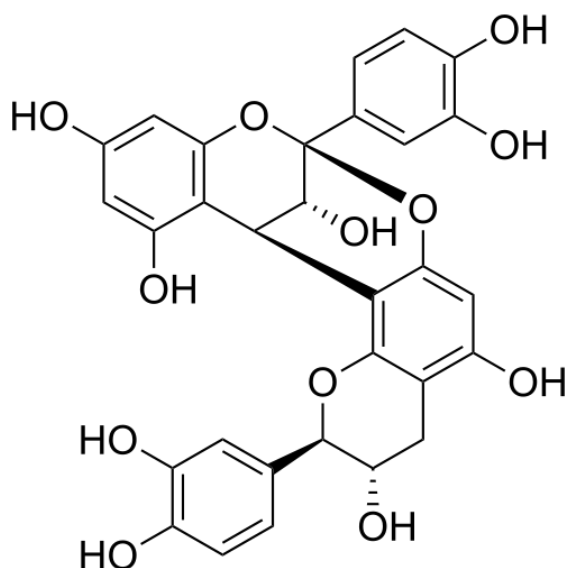
Flavonol	R	R1	R2
Kamferol	H	H	H
Kvercetin	OH	H	H
Kamferol 3- <i>O</i> -arabinozid	H	Arabinoza	H
Kvercetin 3- <i>O</i> -arabinozid	OH	Arabinoza	H
Kamferol 3,7-diraminozid	H	Ramnoza	Ramnoza

Slika 6./Tablica 1. Struktura nekih flavonol glikozida prisutnih u trnini

2.2.4. Procijanidini

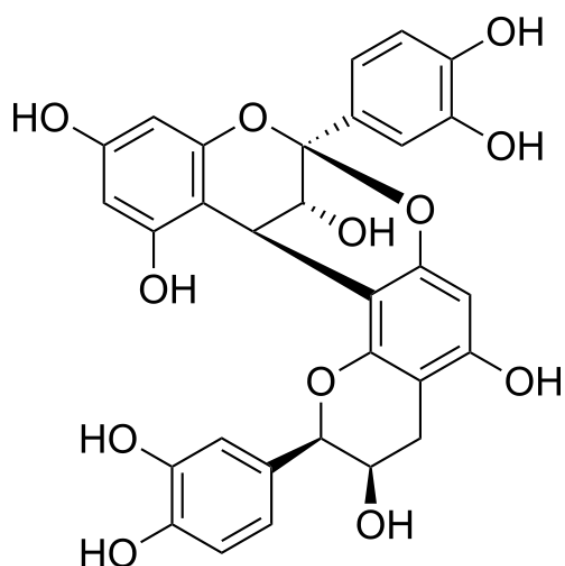
Procijanidini (proantocijanidini) ili kondenzirani tanini su skupina flavonoida koji se sastoje od flavanolskih podjedinica povezanih u dimere, trimere ili oligomere s (-)-epikatehinom i (+)-katehinom kao glavnim podjedinicama [14].

Monomeri oligomernih procijanidini tipa A povezani su C2-*O*-C7 ili C2-*O*-C5 interflavanskom vezom, za razliku od procijanidina tipa B gdje je riječ o C4-C6 ili C4-C8 vezi [9]. Cvjetovi trnine u većim koncentracijama sadrže uglavnom procijanidine tipa A1 i A2 (slika 7.) [2].



Procijanidin A1

epikatehin-(2 β →7,4 β →8)-katehin dimer



Procijanidin A2

epikatehin-(2 β →7,4 β →8)-epikatehin dimer

Slika 7. Strukture glavnih procijanidina u trnini

2.3. Izolacija prirodnih spojeva

U širem smislu riječi izolacija je postupak dobivanja čistog spoja, odnosno pročišćavanje produkata iz reakcijske smjese. U užem značenju izolacija označava izdvajanje prirodnog spoja iz prirodnog materijala. Do razvoja organske sinteze izolacija je bila jedini postupak za dobivanje produkata iz biljaka i životinja, a izolirane su uglavnom bile ljekovite tvari, bojila, mirisi itd. Iako u današnje vrijeme možemo mnoge od tih spojeva dobiti sintetskim putem, svakako ih nazivamo prirodnim spojevima jer su prvotno nađeni u prirodi. Unatoč usavršenim sintetskim tehnološkim postupcima, izolacijska tehnika i dalje je od velike važnosti zbog toga što mnoge produkte koji su nezamjenjivi u svakodnevnom životu još uvijek ne možemo dobiti sintetskim putem [15].

2.3.1. Ekstrakcija

Ekstrakciju možemo opisati kao prijenos tvari iz krute ili tekuće faze u neko otapalo koje se ne smije miješati s tom fazom, odnosno željena tvar treba u njemu biti više topljiva nego u polaznoj fazi. Ekstrakcije su razmjerno jednostavni postupci i imaju vrlo široku primjenu u laboratoriju. Obrada produkata većine organsko-kemijskih reakcija zahtjeva ekstrakciju kao postupak njihova pročišćavanja. Pritom se nekim pogodnim otapalom iz sirova produkta selektivno uklanjanju nusprodukti ili se vrši ekstrakcija produkta, a nečistoće ostaju u polaznoj fazi. Organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju mora zadovoljiti sljedeće uvjete:

- (1) *kemijska indiferentnost* prema prisutnim tvarima;
- (2) što bolja *topljivost* željene organske tvari u otapalu;
- (3) što veća razlika *gustoća* dvaju upotrijebljenih otapala;
- (4) ne previsoko *vrelište* kako bi se otapalo moglo lako upariti;
- (5) nestvaranje *emulzije* tijekom ekstrakcije.

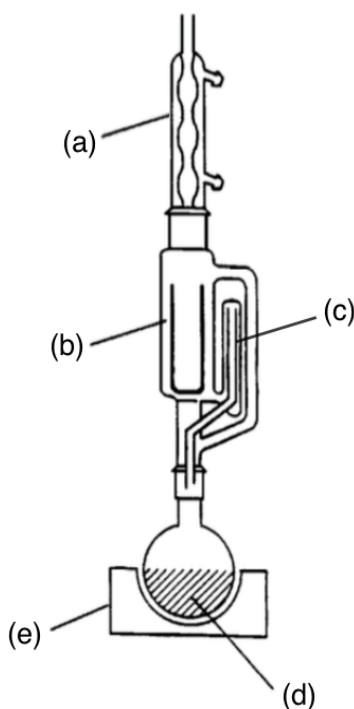
Ekstrakcija se temelji na razdjeljenju, odnosno particiji tvari između dvije faze koje se uzajamno ne miješaju. Većinom su te dvije faze voda i organsko otapalo koje se s njom ne miješa. Omjer koncentracija tvari u dva takva otapala dan je *Nernstovim zakonom razdjeljenja*:

$$K = c_1 / c_2$$

pri čemu je K koeficijent razdjeljenja, a c_1 , c_2 su ravnotežne koncentracije tvari u dva otapala. Koeficijent razdjeljenja je jednak omjeru topljivosti tvari u oba otapala te je pri određenoj temperaturi konstantan [15].

Soxhlet ekstrakcija

Franz von Soxhlet 1879. razvio je novi sustav za ekstrakciju tvari (slika 8.), a prvotno ga je koristio za određivanje lipida u mlijeku. Provođi se u situacijama kada spoj niske topljivosti treba ekstrahirati iz čvrste smjese [16]. Refluksiranjem otapala dolazi do ispiranja krutog materijala pri čemu dolazi do ekstrakcije željenog spoja u tikvicu.



Slika 8. Aparatura za ekstrakciju po Soxhletu [18]

Uzorak se u papirnatoy čajuri sa slojem suhe odmašćene vate stavlja u ekstraktor **(b)** (srednji dio Soxhletove aparature) koji se zatim postupno, preko hladila **(a)**, napuni otapalom koje se koristi za ekstrakciju te se pomoću kapilarne cjevčice **(c)** isprazni u tikvicu. Zatim se doda još toliko otapala da se napuni do otprilike polovice ekstraktora. Kroz hladilo se pusti jaki mlaz vode te se počne sa zagrijavanjem destilacijske tikvice **(d)** u vodenoj ili pješčanoj kupelji **(e)**. Ekstrakcija može trajati nekoliko sati (najčešće 4-6 h), ovisno o vrsti uzorka. Treba je prekinuti u onom trenutku kada se otapalo iz ekstraktora prelije u tikvicu, a čajura u ekstraktoru bude bez otapala [17].

2.3.2. Infracrvena spektroskopija

Zračenje u infracrvenom području odgovara energiji koja izaziva molekulske vibracije. Uzorak izložen infracrvenom zračenju, uz kontinuiranu promjenu valne duljine (λ), apsorbira u spektrometru upadno zračenje koje po energiji odgovara pojedinim molekulskim vibracijama. Energije rasteznih vibracija organskih molekula odgovaraju infracrvenom zračenju s valnim brojevima između 4000 i 1200 cm^{-1} . Taj dio spektra vrlo je koristan za određivanje funkcionalnih skupina organskih spojeva te se često naziva *područje funkcionalnih skupina*, zbog toga što su položaj i karakteristike apsorpcijskih vrpce većine funkcionalnih organskih spojeva pri tim valnim duljinama razmjerno nepromjenjive.

Područje frekvencije u IR-spekttru ispod 1600 cm^{-1} sadrži velik broj vrpce. Uz malo karakterističnih rasteznih vibracija pojedinih veza, tu se nalaze brojne vrpce koje odgovaraju deformacijskim vibracijama molekule kao i nekim složenim vibracijama i vibracijama gornjeg tona. Oblik koji ocrtavaju sve vrpce zajedno karakterističan je za određeni spoj, pa se taj dio spektra zove *područje "otiska prsta"*.

Karakteristične vrpce za organske molekule javljaju se u području od 3300 do 2800 cm^{-1} što se pripisuje rasteznim frekvencijama C-H veza. Vrpce koje se javljaju u području spektra od 3600 do 3200 cm^{-1} karakteristične su za hidroksilne skupine alkohola, a ukoliko je hidroksil dio karboksilne skupine javlja se kao vrlo široka vrpca u području od 3600 do 2500 cm^{-1} . Ta vrpca zajedno s rasteznom frekvencijom karbonila pri 1710 cm^{-1} karakterizira karboksilne kiseline. Aromatski spojevi obično daju niz vrpce između 1600 i 1400 cm^{-1} , a vrpce u području od 900 do 700 cm^{-1} se često primjenjuju za utvrđivanje načina supstitucije na aromatskom prstenu [19].

2.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je specifičan oblik kromatografije koji se često koristi i u kemiji i biokemiji hrane za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju biološki aktivnih komponenata. Kolona HPLC uređaja sadrži stacionarnu fazu kroz koju prolazi mobilna faza,

a detektor na kraju kolone pokazuje retencijsko vrijeme frakcija (vrijeme u kojem se određeni analit eluira). Uzorak koji se analizira injektira se u malom volumenu te pri prolasku kroz kolonu usporava zbog specifičnih fizikalno-kemijskih interakcija koje ovise o prirodi analita i kemijskom sastavu mobilne i stacionarne faze. Često se sastav mobilne faze mijenja tijekom elucije kako bi se postiglo bolje razdjeljivanje komponenata smjese (gradijentna elucija), iako je moguće sve sastojke eluirati istim otapalom iste koncentracije (izokratska elucija).

Ovisno o polarnosti mobilne i stacionarne faze te o načinu razdjeljivanja, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti možemo podijeliti na: kromatografiju normalnih faza, obrnutih faza, gel filtraciju, kromatografiju ionske izmjene i afinitetnu kromatografiju. Razdjeljivanje kod kromatografije normalnih i obrnutih faza temelji se na različitoj polarnosti mobilne i stacionarne faze. Kod kromatografije normalnih faza, stacionarna faza je polarna, a mobilna nepolarna, zbog čega će se polarniji spoj duže zadržavati u koloni te će imati najduže retencijsko vrijeme (odnosno zadnji će napustiti kolonu). Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna, a mobilna polarna pa će onaj spoj najmanje polarnosti zadnji napustiti kolonu. Gel filtracija razdvaja komponente smjese ovisno o molekulskoj masi zbog čega će molekule manje molekulske mase ulaziti u pore gela, prelaziti će veći put te će imati duže retencijsko vrijeme. Kromatografija ionske izmjene u interakciju dovodi ione i naboj stacionarne faze, pri čemu dolazi do međusobnog privlačenja iona suprotnog naboja. Afinitetna kromatografija se temelji na specifičnim reverzibilnim interakcijama proteina i liganda, a elucija se vrši ili uvođenjem novog liganda ili promjenom pH vrijednosti [20].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

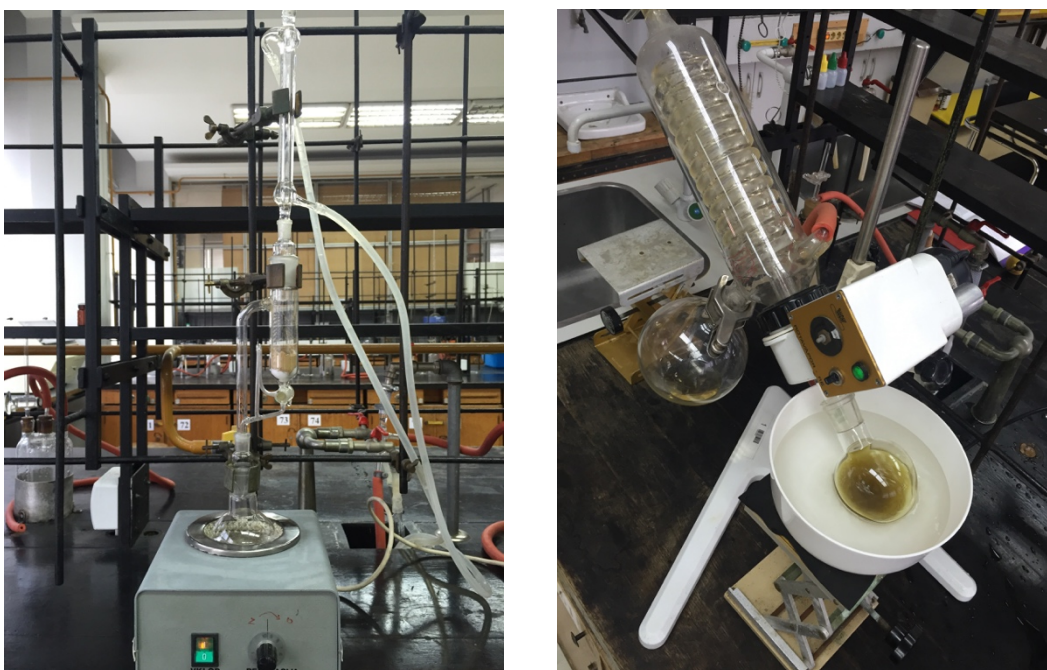
3.1.1. Cvijet i list trnine

U istraživanju je korišten cvijet i list trnine pribavljen od trgovačkog društva Suban ® (Strmec, Hrvatska). Uzorak je sušen prirodno, na prozračnom i sjenovitom mjestu, a prije istraživanja uzorak je čuvan na sobnoj temperaturi.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija po Soxhlet-u

Odvaže se 3,0 g suhog cvijeta i lista trnine s točnošću ± 0.1 . Sastavi se aparatura za Soxhlet ekstrakciju (slika 9.) te se u ekstraktor postavi sloj vate na koji se stavi uzorak. U tikvici s okruglim dnom nalazi se 150 mL 70%-tnog etanola koji se zagrijava do temperature refluksa te dolazi do ekstrakcije koja se provodi oko 1 sat. 10 mL ekstrakta ostavi se za određivanje ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina, a ostatak dobivenog etanolnog ekstrakta se upari na rotacijskom uparivaču (slika 9.) do žutog uljastog ostatka mase 840 mg.



Slika 9. Aparatura za Soxhlet ekstrakciju (lijevo) i rotavapor (desno)

Dobiveni se suhi ostatak otopi u vodi te ekstrahira tri puta s etil-acetatom. Organski slojevi se spoje i upare pri čemu je dobivena tamnozeleno krutina (164.2 mg). Također je i vodeni sloj uparen do suha pri čemu je dobivena tamnosmeđa viskozna tvar (45.4 mg). Dobivenim uparenim ekstraktima snimljen je IR spektar kako bi se karakterizirale najzastupljenije funkcijske skupine.

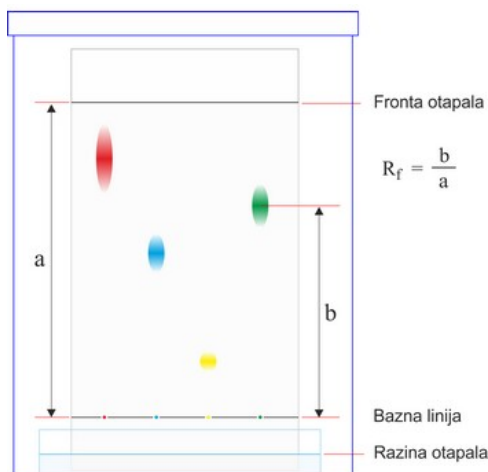
3.2.2. Pročišćavanje dobivenog etil-acetatnog ekstrakta

Pročišćavanje fenolnih spojeva iz cvijeta i lista trnine dobivenih ekstrakcijom po Soxhlet-u provodi se pomoću preparativne tankoslojne kromatografije, a karakterizacija IR spektroskopijom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Tankoslojna kromatografija

U svrhu pročišćavanja uzorka potrebno je provjeriti sastav smjese zbog čega se provodi tankoslojna kromatografija kod koje se odvajanje temelji na adsorpcijskim ili razdjelnim procesima. Najčešće se koristi varijanta adsorpcijske kromatografije na tankom sloju adsorbensa (stacionarne faze) nanesenom na staklenu ploču ili foliju. Kao adsorbensi pretežno se upotrebljavaju silika gel (silicijska kiselina) i aluminijev oksid.

Tvar se otopi u minimalnoj količini etil-acetata te se kapilarom nanese na startnu liniju koja je udaljena 1.5–2 cm od ruba pločice i osuši. Pločica se stavi u kadu u kojoj se nalazi pogodan eluens (mobilna faza) koji se zbog kapilarnih sila diže uz pločicu i eluira sastojke smjese. Osnovni kriterij za identifikaciju pojedinog spoja je njegova pokretljivost na tankom sloju, što se izražava pomoću R_f -vrijednosti (slika 10.). Retencijski faktor predstavlja omjer udaljenosti koju je prošla mrlja (b) i udaljenosti do koje je stigla fronta otapala (a).

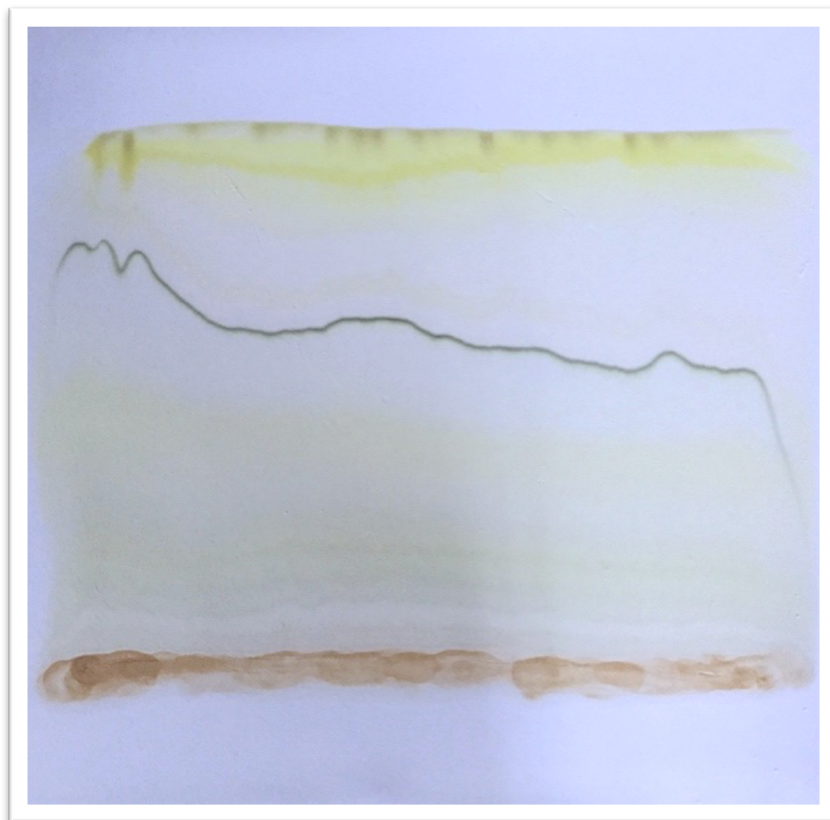


Slika 10. Tankoslojna kromatografija [21]

Prije pročišćavanja sirovog produkta (etil-acetatni ekstrakt) preparativnom tankoslojnom kromatografijom, potrebno je pronaći eluens koji će uspješno razdvojiti sastojke smjese. Etil-acetat se pokazao kao dobar eluens u postupku tankoslojne kromatografije te je korišten u daljnjem postupku pročišćavanja.

Preparativna tankoslojna kromatografija

Smjesa fenolnih spojeva dobivena nakon otparivanja otapala pročišćava se preparativnom tankoslojnom kromatografijom. Na staklene ploče (20×20 cm) koje su presvučene slojem silika gela, nanese se uzorak smjese 1–2 cm od donjeg ruba ploče. Na ploču se nanese maksimalno 100 mg uzorka nakon čega se ploča uroni u pogodan eluens i razvija se kromatogram sve dok fronta otapala ne bude 1–2 cm od gornjeg ruba ploče.



Slika 11. Preparativna tankoslojna kromatografija ekstrakta trnine

Nakon razvijanja kromatograma (slika 11.) ploča se osuši te se pojedina frakcija skine s ploče i prenese u sinter lijevak koji je priključen na vodenu sisaljku. Svaka pojedina frakcija se ekstrahira pomoću otapala u kojem je dobra topljivost uzorka. Nakon pročišćavanja ekstrakta trnine preparativnom tankoslojnom kromatografijom, uz etil-acetat kao eluens, izolirane su četiri dominantne frakcije (tablica 2.):

Frakcija	Boja	Masa (mg)	R _f
1.	žuta	18.9	0.95
2.	zelena	43.0	0.76
3.	svijetlo zelena	36.1	0.31
4.	smeđa	8.3	0.08

Tablica 2. Frakcije dobivene preparativnom tankoslojnom kromatografijom

3.2.3. Infracrvena spektroskopija

IR spektri dobivenih frakcija snimljeni su kao diklormetanske otopine ili KBr pastile na Boem MB 100 Mid FTIR-spektrotometru.

Upareni vodeni ekstrakt:

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3417 (š. j., O–H), 3018 (sl., C–H, aromatski), 2914, (sr., C–H), 2850 (sr., C=C), 1722 (j., C=O), 1608 (j., C=C), 1392 (sl., CH₂), 1056 (sr., C–O, C–C).

Upareni etil-acetatni ekstrakt prije pročišćavanja:

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3396 (š. j., O–H), 3068 (sl., C–H, aromatski), 2914, (sr., C–H), 2844 (sr., C=C), 1701 (j., C=O), 1629, 1698 (sl., C=C), 1438, 1384 (sl., CH₂), 1270 (sr., C–OH), 1127, 1075 (sr., C–O, C–C).

IR spektri frakcija dobiveneih nakon pročišćavanja etil-acetatnog sloja:

1. Frakcija: IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3460 (š. sl., O–H), 3014 (sl., C–H, aromatski), 2929 (sr., C–H), 2873 (sr., C=C), 1726 (j., C=O), 1601 (sl., C=C), 1465, (sl., CH₂), 1379 (sr., C–OH), 1127, 1075 (sr., C–O, C–C).

2. Frakcija: IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3358 (š. sl., O–H), 3018 (sl., C–H, aromatski), 2960, 2929 (sr., C–H), 2873 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1608 (sr., C=C), 1465, 1384 (sl., CH₂), 1297 (sr., C–OH), 1127, 1075 (sr., C–O, C–C).

3. Frakcija: IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3373 (š. sl., O–H), 3015 (sl., C–H, aromatski), 2932 (sr., C–H), 2874 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1603 (sl., C=C), 1465, 1384 (sl., CH₂), 1299 (sr., C–OH), 1126, 1075 (sr., C–O, C–C).

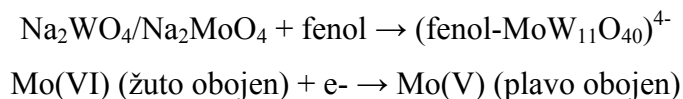
4. Frakcija: IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3368 (š. sl., O–H), 3017 (sl., C–H, aromatski), 2958, 2932 (sr., C–H), 2874 (sr., C=C), 1724 (j., C=O), 1608 (j., C=C), 1465, 1384 (sl., CH₂), 1299 (sr., C–OH), 1126, 1075 (sr., C–O, C–C).

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR spektri: ν = rastezanje (stretching), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, š. = široka vrpca, sl. = slaba vrpca.

3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Fenolni spojevi mogu se analizirati primjenom spektrofotometrijskih i kromatografskih metoda. U usporedbi s kromatografskim, spektrofotometrijske metode su jednostavnije i praktičnije, a za određivanje ukupnih fenola najšire je u upotrebi metoda određivanja s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

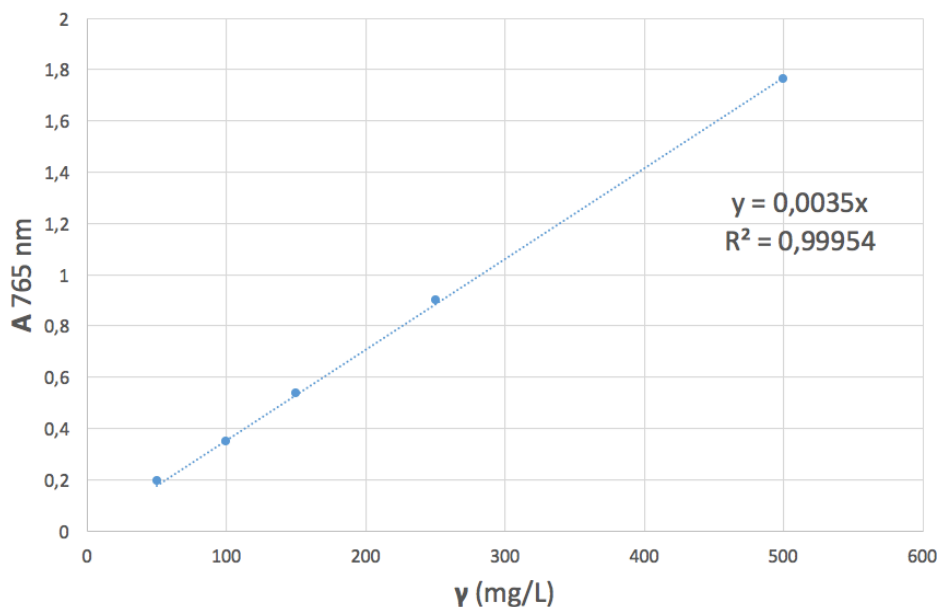


Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima. Mjeri se nastali intenzitet obojenja pri valnoj duljini 765 nm.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 100 µL ekstrakta, 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C (u kupelji od rotavapora). Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju.

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0.5 g galne kiseline. Odvaga se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se otpipetira redom 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu i potom se nadopunjavaju do oznake destiliranom vodom. Koncentracije galne kiseline u tim tikvicama iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 100 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 200 µL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri 50 °C (u kupelji od rotavapora). Za slijepu probu uzima se 100 µL destilirane vode. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću Microsoft Excel programa (slika 12./tablica 3.) pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema dobivenoj jednadžbi pravca.



$\gamma \text{ (mg/L)}$	$A_{765 \text{ nm}}$
50	0.194
100	0.347
150	0.535
200	0.902
500	1.761

Slika 12./ Tablica 3. Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji galne kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $y = 0.0035 \cdot x$, gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm,

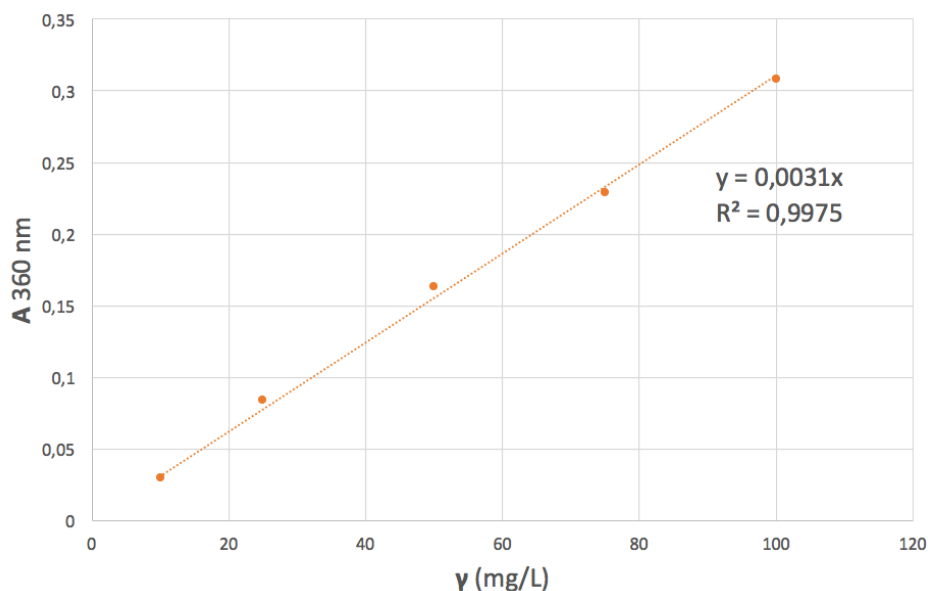
x – koncentracija galne kiseline (mg/L).

Mjerenje apsorbancije ekstrakata lista i cvijeta trnine provedeno je u dvije paralele. Apsorbancija u ekstraktima je nakon razrjeđenja u omjeru 1:5 iznosila 0.629 i 0.678, što daje srednju vrijednost apsorbancije od 0.653. Koncentracija ukupnih fenola izračunata je prema jednadžbi pravca i izražena je u mg GAE/100 g uzorka trnine. GAE je ekvivalent galne kiseline (engl. gallic acid equivalent), a koncentracija je iznosila 46.68 mg GAE/100 g trnine.

3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih flavonola

Određivanje koncentracije ukupnih flavonola se provodi u metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 360 nm.

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 2.5, 5, 10, 25, i 50 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 0.25, 0.5, 1, 2.5 i 5 mL i nadopuni 100%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μL otopine standarda, 250 μL 1g/L HCl u 96% etanolu i 4.55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih flavonola apsorbancija se mjeri na 360 nm. Kvantifikacija ukupnih flavonola provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin (slika 13./tablica 4.)



γ (mg/L)	A 360 nm
10	0.030
25	0.084
50	0.163
70	0.229
100	0.308

Slika 13./ Tablica 4. Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji kvercetina

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $y = 0.0031 \cdot x$, gdje je:

y – apsorbancija pri 360 nm,

x – koncentracija kvercetina (mg/L).

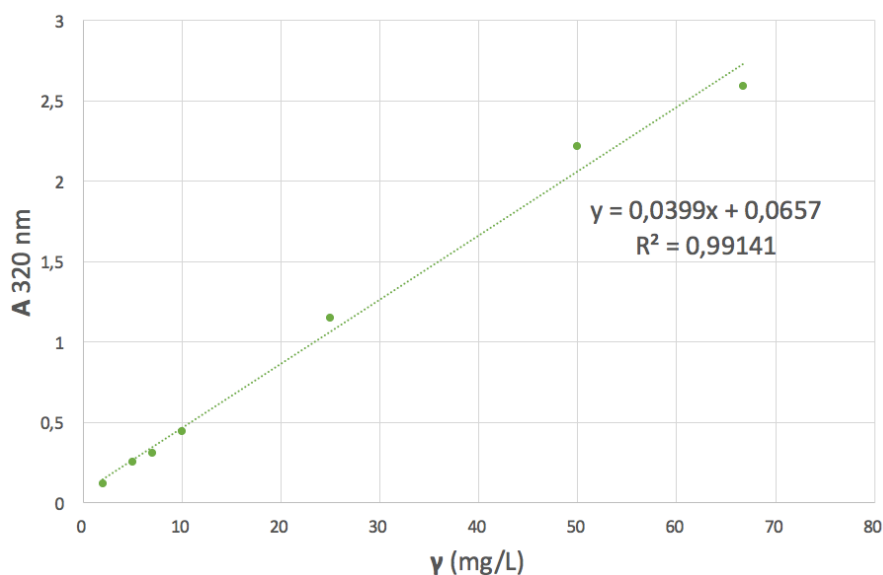
Mjerenje apsorbancije ekstrakata lista i cvijeta trnine provedeno je u dvije paralele. Apsorbancija u ekstraktima je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2.5 iznosila 0.692 i 0.736, što daje srednju vrijednost apsorbancije od 0.714. Koncentracija ukupnih flavonola izračunata je prema jednadžbi pravca i izražena je u mg QE/100 g uzorka trnine. QE je ekvivalent kvercetina (engl. quercetin equivalent), a koncentracija je iznosila 28.79 mg QE/100 g trnine.

3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina

Određivanje koncentracije ukupnih hidroksicimetnih kiselina se provodi u etanolnom ili metanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 320 nm.

Iz alikvotne otopine standarda 100 mg/L potrebno je prirediti razrjeđenja: 10, 25, 50 i 66.7 mg/L na način da se iz otopine alikvota otpipetira redom: 1, 2.5, 5 i 6.67 mL i nadopuni 80%-tnim metanolom u odmjernim tikvicama od 10 mL. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 80%-tni metanol.

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 μ L otopine standarda, 250 μ L 1g/L HCl u 96% etanolu i 4.55 mL 2 g/L HCl. Za određivanje ukupnih hidroksicimetnih kiselina apsorbancija se mjeri na 320 nm. Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu (slika 14./tablica 5.)



γ (mg/L)	A 320 nm
2	0.118
5	0.252
7	0.306
10	0.446
25	1.146
50	2.217
66.7	2.590

Slika 14./ Tablica 5. Ovisnost masene koncentracije o apsorbanciji kafeinske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, jednadžba pravca glasi: $y = 0.0399 \cdot x$, gdje je:

y – apsorbancija pri 320 nm,

x – koncentracija kafeinske kiseline (mg/L).

Mjerenje apsorbancije ekstrakata lista i cvijeta trnine provedeno je u dvije paralele. Apsorbancija u ekstraktima je nakon razrjeđenja u omjeru 1:2.5 iznosila 0.990 i 0.989, što daje srednju vrijednost apsorbancije 0.989. Koncentracija ukupnih hidroksicimetnih kiselina izračunata je prema jednadžbi pravca i izražena je u mg CAE/100 g uzorka trnine. CAE je ekvivalent kafeinske kiseline (engl. caffeic acid equivalent), a koncentracija je iznosila 2.89 mg CAE/100 g trnine.

3.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Prije provođenja analize uzorak ekstrakta cvijeta i lista trnine je otopljen u 100% MeOH u koncentraciji 0.0037 g/5 mL (740 mg/L). Određivanje pojedinačnih fenolnih spojeva provedeno je na Agilent 1260 Infinity HPLC sustavu koji se sastoji od: Agilent 1260 kvaterne pumpe, injektora, 1260 TCC kućišta za kolonu te 1260 UV/Vis PDA VL+ detektora.

Kolona	Nucleosil 100-5C18, 5 μ m (250 \times 4,6 mm I.D.)
Mobilne faza	otapalo A-3%-tna mravlja kiselina u acetonitrilu (v/v) otapalo B-3%-tna mravlja kiselina u vodi (v/v)
Eluiranje	gradijentno
Gradijent	prikazan u tablici 7.
Detektor	UV-Photo Diode Array
Temperatura	sobna
Vrijeme trajanja	35 minuta
Injektirani volumen	20 μ L
Ekvilibracija	2 minute

Tablica 6. Parametri kromatografske analize

t (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)	Protok (mL/min)
0	10	90	0,9
25	40	60	0,9
30	70	30	0,9
35	10	90	0,9

Tablica 7. Gradijent za HPLC analizu fenolnih spojeva

Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih UV/VIS-spektara prema podacima koji su prethodno opisani u literaturi skeniranjem spektra u rasponu od 220 do 380 nm. Flavonol glikozidi identificirani su na 340 nm, a fenolne kiseline na 278 nm. Prema baždarnom pravcu kamferol 3-*O*-rutinozida izražen je apigenin pentozid, kvercetin 3-glukozida izražen je derivat miricetina, a procijanidini A1 i A2 preko procijanidina B1 i B2.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Cilj ovog završnog rada je ispitati sastav fenolnih spojeva dobivenih ekstrakcijom po Soxhlet-u te odrediti koncentraciju ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u dobivenom ekstraktu. Najčešća metoda izolacije fenolnih spojeva iz prirodnih materijala je ekstrakcija uz pogodno otapalo, a u ovom radu korištena je i ispitana metoda ekstrakcije po Soxhletu. Tankoslojna preparativna kromatografija, IR spektroskopija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti korištene su za izolaciju i karakterizaciju pojedinih komponenata smjese.

Prvi dio završnog rada odnosi se na izolaciju fenolnih spojeva iz cvijeta i lista trnine ekstrakcijom po Soxhlet-u s 70 %-tnim etanolom kao otapalom. Drugi dio rada posvećen je pročišćavanju dobivene smjese fenolnih spojeva preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz pogodni eluens te karakterizaciji pojedinih frakcija IR spektroskopijom. U trećem dijelu rada određena je koncentracija ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina u etil-acetatnom ekstraktu, a u četvrtom dijelu rada fenolni spojevi prisutni u etil-acetatnom ekstraktu su identificirani i kvantificirani putem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.

4.2. Izolacija fenolnih spojeva

Cvjetovi i listovi trnine bogat su izvor sekundarnih biljnih metabolita, posebice flavonol glikozida, procijanidina i fenolnih kiselina. Od flavonol glikozida ističu se značajne koncentracije kamferola, kvercetina, kamferol i kvercetin 3-*O*- α -L-arabinofuranozida, kvercetin 3-*O*- β -D-kstilopiranozida te kamferol 3-*O*- α -L-arabinofuranozid-7-*O*- α -L-ramnopiranozida. Od procijanidina u većim koncentracijama prisutni su procijanidini tipa A1 i A2, a od fenolnih kiselina uglavnom derivati hidroksicimetne kiseline [13]. Velika varijabilnost u koncentracijama fenolnih spojeva javlja se uslijed različitih vanjskih čimbenika kao što su vrsta tla, temperatura, svjetlost i geografski položaj.

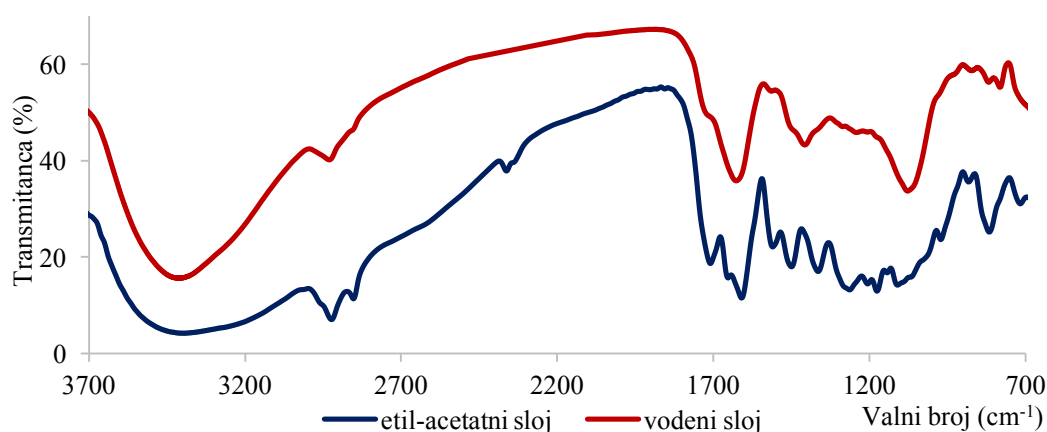
Za izolaciju fenolnih spojeva u ovom je završnom radu korišten osušeni list i cvijet trnine. Postupak izolacije proveden je s etanolom kao otapalom (odjeljak 3.2.1.). Dobiveni etanolni ekstrakt bio je svijetlosmeđe do žute boje. Nakon uklanjanja otapala zaostao je žuti uljasti ostatak, a masa ukupnih fenola je iznosila 840 mg. U svrhu razdvajanja pojedinih fenolnih derivata na temelju njihove polarnosti, provedena je ekstrakcija etil-acetatom i vodom. Upareni etil-acetatni ekstrakt je zelene boje te ugodnog mirisa. S obzirom da je riječ o prirodnim spojevima, ekstrakt se sastoji od nekoliko frakcija što je potvrđeno tankoslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens pri čemu su na silikagel pločici vidljive četiri različito obojene komponente: žuta ($R_f=0.96$), zelena ($R_f=0.87$), svijetlozelena ($R_f=0.77$) i svijetložuta ($R_f=0.48$). Na ovaj način je potvrđeno da je ovim postupkom izolacije dobivena smjesa fenolnih spojeva.

Prije postupka karakterizacije pojedinih komponenata u dobivenom ekstraktu potrebno je provesti postupak pročišćavanja. Dobivena smjesa fenolnih spojeva pročišćena je preparativnom tankoslojnom kromatografijom (odjeljak 3.2.2.) uz etil-acetat kao eluens. Dobivene su četiri dominantne frakcije: žuta krutina (18.4 mg), zelena krutina (43.0 mg), svijetlozelena krutina (36.1 mg) te smeđa (8.3 mg) krutina, kojima je snimljen IR spektar kako bi se karakterizirale funkcijske skupine spojeva koji prevladavaju u određenoj frakciji.

4.3. Infracrvena spektroskopija

Infracrveno zračenje emitiraju molekule zahvaljujući svojim molekulskim vibracijama. Apsorbiranjem infracrvenog zračenja molekulske vibracije se pobuđuju, pa molekule počinju jače vibrirati. IR-spektar obuhvaća regiju u spektru elektromagnetskog zračenja iznad najviše frekvencije mikrovalova i ispod frekvencije vidljivog dijela spektra. Dijelimo ga na dva područja: *područje funkcijskih skupina*, pri čemu većina funkcijskih skupina apsorbira zračenje u tom području, te *područje otiska prsta* koje je karakteristično za svaki spoj [19].

IR-spektri su snimljeni kao diklormetanske otopine ili KBr pastile fenolnih spojeva izoliranih iz osušenih listova i cvjetova trnine. Nakon postupka ekstrakcije tekuće-tekuće dobivene su dvije frakcije, vodena i etil-acetatna, kojima je snimljen IR-spektar kao KBr pastile (slika 15.). Rastezne vibracije hidroksilnih skupina alkohola pojavljuju se kao široke apsorpcijske vrpce u području 3200–3600 cm^{-1} . Slobodna hidroksilna skupina registrira se kao uska vrpca kod približno 3600 cm^{-1} , a obično se zamjećuje širok signal koji odražava vodikovu vezu između hidroksilnih skupina molekula alkohola.

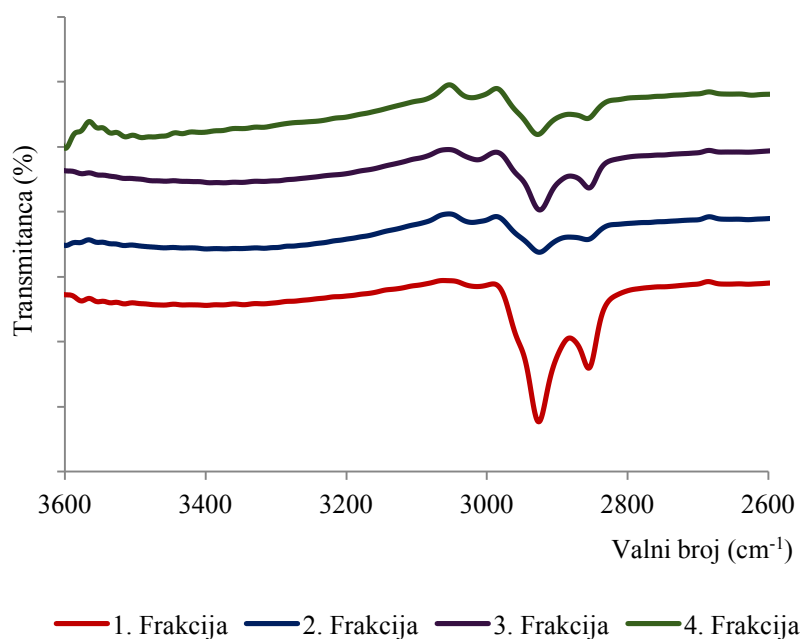


Slika 15. IR-spektar spojeva izoliranih nakon ekstrakcije tekuće-tekuće

U IR-spektrima oba ekstrakta (slika 15.) vidljiva je apsorpcijska vrpce oko 3400 cm^{-1} koja se pripisuje hidroksilnoj skupini. Intenzitet tih apsorpcijskih vrpce je jak i širok, što može ukazivati na prisutnost većeg broja hidroksilnih skupina u spojevima koji se nalaze u smjesi odnosno te skupine

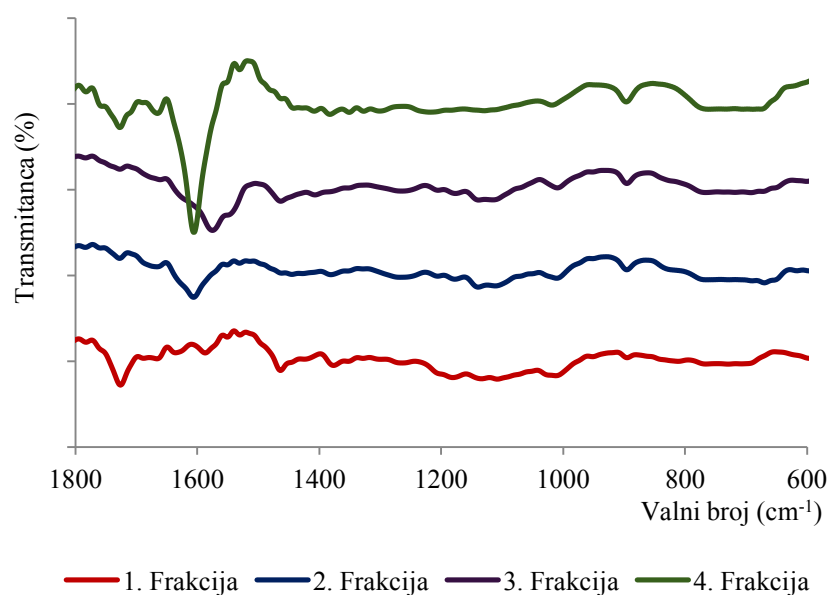
mogu pripadati fenolnim spojevima i ugljikohidratnim komponentama ako je riječ o glikozidnim derivatima (flavonol glikozidi). Prisutnost ove vrpce može se pripisati i karboksilnoj skupini budući da su u spektrima obje frakcije vidljiva i apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta oko 1700 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu kiseline ili estera. S obzirom da su u listovima i cvjetovima trnine prisutni derivati hidroksicimetne kiseline ove vrpce mogu ukazati na prisutnost upravo ovih spojeva u dobivenom ekstraktu. U dijelu spektra koji karakterizira vibracije istezanja C–H kod zasićenih, nezasićenih veza i aromatskih spojeva ($2800\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$), vibracije istezanja veza =C-H pokazuju apsorpciju u području od $3125\text{--}3010\text{ cm}^{-1}$, a intenzitet vrpce u odnosu na zasićene spojeve je manji. Alkani (zasićeni spojevi) imaju apsorpcijske vrpce između 2800 i 3000 cm^{-1} jer je to područje svojstveno za rastezne frekvencije veze C–H. U sve četiri frakcije asignirane su vrpce slabog intenziteta oko 3017 cm^{-1} što odgovara vibracijama istezanja veza =C-H i apsorpcijske vrpce srednjeg intenziteta oko 2928 cm^{-1} što se pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C–H.

Nakon ekstrakcije tekuće-tekuće dobiveni etil-acetatni sloj je pročišćen preparativnom tankoslojnom kromatografijom te je dobivenim frakcijama snimljen IR-spektar kao diklormetanske otopine (slika 16. i 17.). U prvom dijelu (od 2600 do 3600 cm^{-1}) spektra sve četiri frakcije vidljive su apsorpcijske vrpce slabog intenziteta oko 3016 cm^{-1} što odgovara vibracijama istezanja veza =C-H i dvije apsorpcijske vrpce srednjeg intenziteta oko 2928 i 2874 cm^{-1} što se pripisuje rasteznoj frekvenciji veze C–H. U spektru u području koje je karakteristično za OH-skupinu (oko 3400 cm^{-1}) vidljiva je široka apsorpcijska vrpca vrlo slabog intenziteta što ukazuje na manji broj slobodnih hidroksilnih skupina (slika 16.).



Slika 16. Dio IR spektra četiri frakcije trnine od 2600 do 3600 cm^{-1}

U drugom dijelu spektra (od 600 do 1800 cm^{-1}) vidljive su razlike u pojedinim frakcijama. Apsorpcijska vrpca istezanja C=O skupine je velikog intenziteta i nalazi se u području između 1740 i 1630 cm^{-1} , gdje su ostale skupine vrlo slabo zastupljene. U IR-spektru 1. i 4. frakcije prisutna je apsorpcijska vrpca srednjeg intenziteta pri 1728 cm^{-1} koja se pripisuje vibracijama istezanja C=O skupine estera. U spektrima 2. i 3. frakcije u tom području vidljive su apsorpcijske vrpce slabog intenziteta. Rastezne frekvencije dvostrukih veza ugljik-ugljik kod alkena smještene su između 1620 i 1680 cm^{-1} . Vrpce su obično slabe, a u nekim se slučajevima se ne pojavljuju. Apsorpcijske vrpce terminalnih ili konjugiranih alkena obično su jake.



Slika 17. Dio IR spektra četiri frakcije trnine od 600 do 1800 cm^{-1}

U spektrima sve četiri frakcije vidljiva je apsorpcijska vrpca slabog intenziteta pri 1625 cm^{-1} te u 2. (srednja) i 4. (jaka) frakciji pri 1609 cm^{-1} koje se pripisuju vibracijskom istezanju konjugiranih C=C veza. Apsorpcijske vrpce u dijelu spektra od 1030 do 1100 cm^{-1} odgovaraju rasteznoj frekvenciji jednostruke veze C–O. U sve četiri frakcije pokazuje se srednje jaka apsorpcijska vrpca pri oko 1042 cm^{-1} , a može se pripisati eterskoj vezi koja je prisutna u derivatima hidroksicimetne kiseline ili drugih metiliranih fenolnih spojeva. Asignirana apsorpcijska vrpca vrlo slabog intenziteta pri $\sim 640 \text{ cm}^{-1}$ u spektrima svih ekstrakta potvrđuje prisutnost glikozidne veze.

Na osnovu asigniranih apsorpcijskih vrpca, može se potvrditi prisutnost funkcijskih skupina koje su karakteristične za fenolne spojeve prisutne u listu i cvijetu trnine, a primarno se to odnosi na flavonol glikozide i derivate hidroksicimetne kiseline koji su zastupljeni u ispitivanom materijalu.

4.4. Ukupna koncentracija fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina

U ovom radu određena je ukupna koncentracija fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina nakon ekstrakcije po Soxhlet-u s 70 %-tnim etanolom kao otapalom. Masena koncentracija ukupnih fenola iznosi 46.68 mg GAE/g, flavonola 28.79 mg QE/g, a hidroksicimetnih kiselina 2.89 mg CAE/g.

Istodobno je u Laboratoriju za organsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu u sklopu diplomskog rada (Karlo Fadić) provedena i klasična ekstrakcija lista i cvijeta trnine uz 70%-tni etanol te su vrijednosti masene koncentracije za ukupne fenole iznosile 57.14 mg GAE/g, za flavonole 26.93 mg QE/g, a hidroksicimetne kiseline 2.79 mg CAE/g. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da promjenom postupka izolacije nisu uočene znatne razlike u masenim koncentracijama.

Iz literaturnih je navoda [13] poznato da su od svih fenolnih spojeva u cvijetu trnine najzastupljeniji flavonoli, što je vidljivo i iz rezultata dobivenih u okviru ovog završnog rada.

4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Nakon provedene tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti potvrđeni su literaturni navodi: od fenolnih kiselina najzastupljeniji su derivati hidroksicimetne kiseline (klorogenska i *p*-kumarinska kiselina), od procijanidina se ističu visoke koncentracije procijanidina tipa A1 i A2, a najveća koncentracija fenolnih spojeva pripada flavonol glikozidima što je u skladu s provedenim mjerenjima ukupnih fenola, flavonola i hidroksicimetnih kiselina (odjeljak 4.4.)

Fenolni spoj	Masena koncentracija (mg/L)
Klorogenska kiselina	10.48
<i>p</i> -kumarinska kiselina	9.73
Apigenin-pentozid	3.05
Procijanidin A1	35.15
Procijanidin A2	32.00
Kvercetin-pentozilheksozid	10.33
Kvercetin-rutinozid	34.81
Kamferol-pentozilheksozid	33.87
Kamferol-3-glukozid	43.65
Kamferol-heksozid	4.82
Kamferol-heksozilramnozid	12.04
Kamferol-pentozid	56.35
Kamferol-ramnozid	74.46
Kamferol-heksozid	5.92
Kamferol-acetilrutinozid	19.44
Miricetin (der.)	2.51
Katehin	6.52

Tablica 8. Koncentracije fenolnih spojeva prisutnih u cvijetu i listu trnine

5. ZAKLJUČAK

- ✓ U prvom dijelu završnog rada provedena je izolacija fenolnih spojeva ekstrakcijom po Soxhlet uz 70 % etanol osušenih listova i cvjetova trnine.
- ✓ U drugom dijelu završnog rada dobivena smjesa fenolnih spojeva podvrgnuta je pročišćavanju preparativnom tankoslojnom kromatografijom pri čemu su izolirane četiri dominantne frakcije.
- ✓ Dobivene frakcije karakterizirane su pomoću IR-spektroskopije. U snimljenim spektrima vidljive su apsorpcijske vrpce koje se pripisuju hidroksilnoj, esterskoj i karbonilnoj skupini što je karakteristično za fenolne spojeve, a posebice za derivate hidroksicimetne kiseline poput klorogenske i *p*-kumarinske kiseline koje su zastupljene upravo u listu i cvijetu trnine. Također je uočena i apsorpcijska vrpca pri 640 cm^{-1} koja odgovara glikozidnoj vezi što dokazuje prisutnost flavonol glikozida, poput kvercetin 3-rutinozida, kvercetin 3-glukozida, kamferol 3-rutinozida, koji su također prema literaturnim navodima zastupljeni u trnini.
- ✓ U trećem dijelu završnog rada određena je masena koncentracija ukupnih fenola u etil-acetatnom ekstraktu koja je iznosila 46.68 mg GAE/g, zatim ukupnih flavonola 28.79 mg QE/g i ukupnih hidroksicimetnih kiselina 2.89 mg CAE/g. Provedena kvantifikacija etil-acetatnog ekstrakta tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti potvrdila je prisutnost flavonol glikozida u većoj količini u odnosu na ostale fenolne derivate.
- ✓ Na temelju provedenih ispitivanja može se zaključiti da se u osušenim listovima i cvjetovima trnine nalaze fenolni spojevi koji mogu imati izrazit biološki potencijal.

6. LITERATURA

- [1] Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), Luxembourg, str. 145.
- [2] Olszewska, M., Głowacki, R., Wolbís, M., Bald, E. (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica*. **58** (3), 199-203.
- [3] Wolbiś, M., Olszewska, M., Wesółowski, W. J. (2001) Triterpenes and sterols in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica*. **58** (6), 459-462.
- [4] Pinacho, R., Caverro, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calvo M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*. **19**, 49-62.
- [5] Radovanović, B. C., Milenković Anđelković, A. S., Radovanović, A. B., Anđelković, M. Z. (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Polyphenol Extracts from Wild Berry Fruits Grown in Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **12** (5), 813-819.
- [6] Veličković, J. M., Kostić, D. A., Stojanović, G. S., Mitić, S. S., Mitić, M. N., Randelović, S. S., Đorđević, A. S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijska Industrija*. **68**, 297-303.
- [7] Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013) Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*. **141** (4), 3721-3730.
- [8] Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009) Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. **25**, 1201-1205.
- [9] Tsao, R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. **2** (12), 1231-1246.
- [10] Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. **130**, 2073-2085.
- [11] Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. **55**, 279-290.
- [12] Kumar, S., Pandey, A. K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. **2013**, 1-16.
- [13] Olszewska, M., Wolbís, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica*. **58** (5), 367-372.
- [14] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**, 572-584.

- [15] Rapić, V. (2008) Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, 2. izd., Školska knjiga, Zagreb
- [16] Luque de Castro, M. D., Priego-Capote, F. (2010) Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. **1217** (16), 2383-2389.
- [17] James, C. S. (1995) Analytical Chemistry of Foods, 1. izd., Blackie Academic & Professional, Glasgow
- [18] Reeves, R. N. (1994) Environmental analysis, 1. izd., John Wiley, New York
- [19] Pine, S. H. (1994) Organska kemija, 3. izd., Školska knjiga, Zagreb
- [20] Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., Sharma, P. K. (2010) High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*. **2** (5), 22-26.
- [21] Generalić, E. Tankoslojna kromatografija. *Englesko-hrvatski kemijski rječnik i glosar*, <<http://glossary.periodni.com>>. Pristupljeno 19. lipnja 2016.